

VALIDASI METODE UJI KADAR ALBENDAZOL DENGAN MENGGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER UV/ VIS

AMBARWATI, MARIA FATIMA PALUPI DAN UNANG PATRIANA

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur Bogor 16340

ABSTRAK

Telah dilakukan validasi metode terhadap uji kadar albendazol dengan menggunakan metode spektrofotometri- di Unit Uji Farmasetik dan Premiks, Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH). Metode uji ini merupakan metode yang dikembangkan oleh BBPMSOH dengan menggunakan spektrofotometer UV/VIS. Parameter validasi metode yang diukur adalah: presisi, akurasi, linearitas, limit deteksi dan limit kuantitasi. Parameter uji presisi, akurasi dan linearitas menunjukkan hasil yang baik, dimana nilai limit deteksi adalah 0,22 µg/mL dan limit kuantitasi adalah 2,15 µg/mL. Hasil validasi dari analisis albendazol menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis memberikan hasil yang dapat diterima dan dapat digunakan sebagai metode yang baik untuk menjamin mutu hasil yang valid.

Kata kunci: validasi, metoda uji, albendazol, spektrofotometer UV-VIS

ABSTRACT

Validation for analysis method of albendazole using spectrophotometry has been conducted in Pharmaceutical and Premix Assay Unit, the National Veterinary Drug Assay Laboratory (NVDAL). This analysis method was a developed method using spectrophotometric UV-Vis. The parameters of validation were carried out: precision, accuracy, linearity, limit of detection (LOD) and limit of quantity (LOQ). Precision, accuracy and linearity showed good results with LOD values of 0.22 µg mL⁻¹ and LOQ of 2.15 µg mL⁻¹, respectively. The results of validation tests showed that albendazole analysis using spectrophotometric method can be used as a good method to provide a valid test of quality assurance.

Keywords: validation, testing method, albendazole, spectrophotometer UV-VIS

PENDAHULUAN

Salah satu tugas dan fungsi Balai Besar Pengujian Mutu Obat Hewan (BBPMSOH) dalam SK Menteri Pertanian No. 628/628/Kpts/OT.140/12/2003 adalah pelaksanaan pengembangan teknik dan metoda pengujian mutu obat hewan. Sejalan dengan hal tersebut, pada buletin BBPMSOH edisi No. 16 Tahun 2011 telah dilakukan pengembangan pengujian albendazol dengan metode spektrofotometri. Selaku laboratorium penguji yang berpedoman pada ISO SNI/IEC 17025:2008, maka BBPMSOH harus melakukan validasi terhadap metode baru yang dikembangkan.

Menurut ISO SNI/IEC 17025: 2008 validasi adalah konfirmasi melalui pengujian dan penyediaan bukti objektif bahwa persyaratan tertentu untuk suatu maksud terpenuhi. Jadi validasi metoda pengujian adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (6). Parameter unjuk kerja pengujian antara lain adalah presisi (keseksamaan), akurasi (kecermatan), spesifisitas, batas deteksi, batas kuantitasi, linearitas, rentang dan ketangguhan (5,6). Pemilihan pa-

rameter yang akan diuji tergantung dari jenis dan metode pengujian yang akan divalidasi.

Validasi metode sangat penting dilakukan oleh laboratorium, karena dengan melakukan validasi dapat diketahui tingkat kepercayaan yang dihasilkan dari suatu metode pengujian (5). Selain itu, validasi metode merupakan salah satu bentuk jaminan mutu hasil kepada pelanggan, dimana metode yang digunakan telah terbukti baik sehingga hasil yang dikeluarkan oleh BBPMSOH adalah valid.

Albendazol merupakan anthelmintik yang cukup dikenal luas di dunia kedokteran hewan. Jumlah obat hewan yang mengandung albendazol yang telah terdaftar di Indonesia terus meningkat. Dalam Indeks Obat Hewan Indonesia tahun 2007 terdapat 24 produk sedangkan pada Indeks Obat Hewan Indonesia 2009 meningkat menjadi 35 produk. Pada tahun 2009 jumlah sampel dengan zat aktif albendazol yang masuk ke BBPMSOH dalam rangka registrasi ulang maupun baru adalah 35,71% dari keseluruhan sampel anthelmintik sedangkan pada tahun 2010 jumlahnya meningkat menjadi 39,13% dari total sampel anthelmintik.

Albendazol merupakan anthelmintik spektrum luas yang umumnya digunakan untuk membasmi nematode

ataupun cestoda di ruminansia. Albendazol diindikasikan untuk membasmi endoparasit di sapi yaitu *Ostertagia ostertagi*, *Haemonchus spp.*, *Trichostrongylus spp.*, *Nematodius spp.*, *Cooperia spp.*, *Bunostomum phlebotomum*, *Oesphagostomum spp.*, *Dictacaulus spp.*, *Fasciola hepatica* (dewasa), dan *Moniezia spp.* Albendazol juga digunakan untuk mengontrol endoparasit pada domba, kambing dan babi. Pada kucing, albendazol digunakan untuk mengobati infeksi *Paragonimus kellicotti* dan juga digunakan untuk mengobati *capillariasis* baik pada kucing maupun anjing. Khusus pada anjing, albendazol digunakan untuk mengobati infeksi *Filaroides*. Umumnya albendazol tersedia dalam bentuk cair maupun bolus (7,8).

Mengingat jumlah sampel yang cukup signifikan dan pentingnya memberikan jaminan mutu hasil kepada pelanggan dengan hasil uji yang valid, maka perlu dilakukan validasi terhadap metode pengujian albendazol dengan menggunakan spektrofotometri yang telah dikembangkan oleh BBPMSOH. Hal ini penting untuk memberikan bukti bahwa metode yang dikembangkan tersebut memiliki unjuk kerja yang baik.

MATERI DAN METODE

Alat dan Bahan

Sampel anthelmintik yang mengandung albendazol, asam asetat glasial 100% (CH_3COOH), asam asetat anhidrida, kristal violet, asam perklorat 70% (HClO_4), metanol p.a., asam klorida 37%, standar albendazol, neraca, erlenmeyer 300 mL, buret, statif, *magnetic stirrer*, vortex, labu ukur 500 mL, pipet ukur, labu ukur 50 mL, spektrofotometer UV-Vis.

Uji Presisi

Timbang sejumlah sampel setara 50 – 100 mg albendazol, masukkan dalam labu ukur 50 ml dan encerkan dengan pelarut anthelmintik (8.1 mL HCl 37% dilarutkan dengan methanol p.a. sampai 500 mL), buat pengenceran bertingkat dengan menggunakan pelarut anthelmintik sehingga didapatkan konsentrasi akhir 10 – 11 ppm. Untuk standar, timbang dengan tepat 10 mg standar albendazol (SIGMA), encerkan dan buat pengenceran bertingkat dengan menggunakan pelarut anthelmintik sehingga mendapatkan konsentrasi akhir adalah 10 ppm.

Hitung kadar yang didapat dari sampel dan ulangi pengujian diatas 10 (sepuluh) kali kemudian hitung koefisien variasi (CV) (4,6). Rumus untuk menghitung kadar albendazol dapat dilihat dengan rumus sebagai berikut:

$$\frac{\text{Aspl}}{\text{Astd}} \times \frac{\text{Cstd}}{\text{Cspl}} \times 100\% \text{ (rumus 1)}$$

Aspl = serapan sampel

Astd = serapan standar

Cstd = konsentrasi standar

Cspl = konsentrasi sampel

Nilai CV didapat dengan menghitung standar deviasi (SD), kemudian nilai Relatif Standar Deviasi (RSD) dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{SD} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

$$\text{RSD} = \frac{\text{SD}}{\bar{x}}$$

CV = RSD x 100% (rumus 2)

n = jumlah pengulangan

x = kadar albendazol pengujian ke-x

$\bar{x}$ = rata-rata kadar albendazol.

Nilai CV metode pengujian ini kemudian dibandingkan dengan CV Horwitz. Nilai CV Horwitz didapatkan dengan rumus:

$$\text{CV} (\%) = 0.66 \times 2^{1-(0.5 \times C)} \text{ (rumus 3)}$$

C = konsentrasi analit saat diukur

Uji Akurasi

Penghitungan unjuk kerja akurasi metode dilakukan dengan membandingkan hasil uji spektrofotometri dengan hasil uji metode standard yaitu dengan metode titrasi bebas air (4). Uji spektrofotometer dilakukan sebagaimana dalam uji presisi sedangkan uji titrasi bebas air dilakukan sebagaimana terdapat dalam Farmakope Obat Hewan Indonesia.

Cara kerja uji titrasi bebas air adalah sebagai berikut timbang sampel setara dengan 50 – 100 mg albendazol, tambah 10 ml asam asetat glasial dan 40 ml asam asetat anhidrida. Titrasi dengan HClO_4 0,1 N (larutan 8,5 mL HClO_4 70%, 500 mL asam asetat glasial, 21 mL asam asetat anhidrida dan tambah asam asetat glasial sampai batas volume 1000 mL) dengan menggunakan kristal violet sebagai indikator. Setiap mL asam perklorat 0,1 N setara dengan 26,53 mg $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ (albendazol). Hitung kadar albendazol dalam sampel dengan menggunakan rumus:

$$\frac{V \times 26,53}{B \text{ spl}} \times 100\% \text{ (rumus 4)}$$

V = volume (mL) HClO_4 0.1 N mencapai titik akhir

B spl = mg kandungan albendazol dalam sampel (3)

Ulangi masing-masing pengujian tersebut diatas 10 (sepuluh) kali dan lakukan uji statistik dengan uji t ($\alpha = 0.05$) untuk mengetahui perbedaan hasil dari kedua metode tersebut.

Uji Linieritas

Timbang sejumlah 10 mg standar albendazol, lakukan pengenceran bertingkat dengan menggunakan pelarut anthelmintik sehingga mendapatkan 5 (lima) konsentrasi : 2,5 ppm, 5,00 ppm, 7,5 ppm, 10 ppm dan 20 ppm. Ukur serapan dari tiap konsentrasi dengan menggunakan spektrofotometer UV dengan panjang gelombang 254 nm dan hitung nilai koefisien korelasi (r). Nilai r didapat dari analisis regresi linier dengan rumus (4):

$$y = a + bx \text{ (rumus 5)}$$

a = intersep
b = slope
x = serapan

Limit Deteksi dan Limit Kuantisasi

Batas deteksi dan kuantisasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi yang didapat dari uji linearitas. Untuk mendapat nilai batas deteksi dan kuantisasi gunakan nilai slope (b) dan simpangan baku residual (SD_x) (6). Hitung Limit Deteksi dengan rumus:

$$\frac{3 \times SD_x}{b} \text{ (rumus 6)}$$

Sedangkan Limit Kuantisasi dihitung dengan rumus:

$$\frac{10 \times SD_x}{b} \text{ (rumus 7)}$$

SD_x = simpangan baku residual
b = slope

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Presisi

Presisi atau keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen (6). Uji presisi metode ini dilakukan dengan cara keterulangan yang dilakukan oleh penguji yang sama atau repeatabilitas. Hasil pengujian kadar albendazol dengan menggunakan spektrofotometer UV adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Hasil Uji Kadar Albendazol Dengan Spektrofotometer

Pengulangan ke:	Kadar Albendazol
1	103,19%
2	98,08 %
3	98,98 %
4	99,17 %
5	98,34 %
6	96,59 %
7	97,34 %
8	95,91 %
9	95,42 %
10	94,46 %
Rata-rata	97,75 %
SD	2,47
RSD	0,025

Nilai CV dari pengujian ini adalah 2,52 % sedangkan CV Horwitz yang terhitung adalah 4,19%. Dari hasil tersebut tampak bahwa CV dari hasil pengujian dengan metode ini lebih kecil dari CV Horwitz. Menurut Harmita (2004) suatu metode pengujian dikatakan baik jika nilai CV nya lebih kecil dari CV Horwitz, sehingga bisa dikatakan bahwa metode uji albendazol dengan menggunakan spektrofotometri mempunyai presisi yang baik.

Uji Akurasi

Uji akurasi dapat dilakukan dengan beberapa metode, salah satunya adalah dengan membandingkan hasil dari metode yang divalidasi dengan hasil uji metode standar (4). Metode standar yang digunakan adalah dengan titrasi bebas air yang terdapat dalam Farmakope Obat Hewan Indonesia 2009. Hasil uji kadar albendazol dengan metode titrasi bebas air terdapat dalam Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Kadar Albendazol dengan Metode Titrasi Bebas Air

Pengulangan ke:	Kadar Albendazol
1	97.90 %
2	100.34 %
3	100.34 %
4	97.90 %
5	97.90 %
6	97.90 %
7	97.90 %
8	97.90 %
9	97.90 %
10	97.90 %
Rata-rata	98,39 %
SD	1.029

Hasil uji dengan menggunakan spektrofotometer yang telah dilakukan pada pengukuran presisi metode dibandingkan dengan hasil pada Tabel 2. Kedua hasil tersebut dibandingkan dan diuji statistik dengan *t-test student* ($\alpha = 0,05$) dan didapatkan bahwa keduanya tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($t_{\text{hitung}} = 0,757$; $t_{\text{tabel}} = 2,179$; $db = 12$).

Uji Linearitas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel (6). Hasil absorbansi untuk uji linearitas terdapat dalam tabel 3.

Tabel 3. Hasil Serapan Untuk Uji Linearitas

Std Albendazol (mg/L.)	Serapan	Regresi
0,0	0,000	0,005
2,5	0,070	0,073
5,0	0,155	0,141
10,0	0,272	0,277
20,0	0,547	0,548
40,0	1,020	1,090
Intersep	0,0154	
Slope	0,0254	
r	0,9992	

Dari data Tabel 3. didapatkan nilai r adalah 0.9992, sedangkan syarat dari suatu metode uji mempunyai linearitas yang baik jika nilai r lebih besar dari 0,98 (4). Hal ini membuktikan bahwa metode uji albendazol dengan spektrofotometri mempunyai linearitas yang baik.

Limit Deteksi dan Limit Kuantisasi

Definisi batas deteksi menurut Harmita (2004) adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi dan masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Dari hasil perhitungan diperoleh batas deteksi untuk pengujian albendazol dengan metode spektrofotometri yaitu pada konsentrasi 0,22 $\mu\text{g/mL}$. Ini berarti bahwa albendazol pada konsentrasi tersebut masih dapat terbaca absorbansinya tetapi tidak dapat digunakan dalam perhitungan, karena dapat membuat bias dalam perhitungan.

Sedangkan batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Nilai batas kuantitasi pada pengujian ini sebesar 2,15 $\mu\text{g/mL}$. Konsentrasi tersebut merupakan

konsentrasi terkecil yang tidak menimbulkan bias dalam perhitungan.

KESIMPULAN

Metode uji kadar albendazol dengan spektrofotometer telah divalidasi dan memiliki presisi, akurasi dan linearitas yang baik. Limit deteksinya adalah 0,22 $\mu\text{g/mL}$ dan limit kuantisasi adalah 2,15 $\mu\text{g/mL}$. Dari hasil validasi ini maka metode uji kadar albendazol dengan spektrofotometri dapat digunakan sebagai metode uji yang baik, karena mampu memberikan jaminan mutu hasil yang valid.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis sampaikan kepada M. Ridho Afifi yang telah membantu selama proses pembuatan makalah ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Anonim, 2007**, Indeks Obat Hewan Indonesia, Edisi VI, Asosiasi Obat Hewan Indonesia, Jakarta. Hal 417.
2. **Anonim, 2009**, Indeks Obat Hewan Indonesia, Edisi VII, Asosiasi Obat Hewan Indonesia, Jakarta. Hal 561.
3. **Anonim, 2009**, Farmakope Obat Hewan Indonesia Jilid II Edisi IV, Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, Jakarta. Hal 417.
4. **BPOM, 2009**, Petunjuk Operasional Penerapan Cara Pembuatan Obat Yang Baik 2006, Badan Pengawas Obat dan Makanan – Republik Indonesia. Hal 583 – 609
5. **Hadi, A., 2007**, Pemahaman dan Penerapan ISO/IEC 17025 Persyaratan Umum Kompetensi Laboratorium Pengujian dan Laboratorium Kalibrasi, PT Gramedia Pustaka Utama. Hal 259 – 274.
6. **Harmita, 2004**, Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya, Majalah Ilmu Kefarmasian, Vol. 1, No.3, Desember 2004, Hal 117 – 135.
7. **Mayer BR., 1991**, Anthelmintics in "Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics", 5th edition, ELBS with Bailliere Tindal, London. Hal 527 – 528.
8. **Plumb C.D., 2005**, Plumbs: Veterinary Drug Handbook 5th Ed., Blackwell Publishing - London, Hal 27-29.